

固相萃取-高效液相色谱法测定大黄酸血药浓度 及在大鼠体内的药动学规律

冯素香^{1,2}, 谢新年¹, 李建生¹, 屈凌波², 梁生旺³, 王淑美^{3*}

(1. 河南中医学院, 郑州 450008; 2. 郑州大学, 郑州 450001;

3. 广东药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的: 建立测定大鼠血浆中大黄酸的固相萃取-高效液相色谱方法, 研究大黄酸在大鼠体内的药动学规律。方法: 单次给予 SD 大鼠不同剂量的大黄酸, 于不同时间点采集大鼠血浆。以固相萃取法处理血浆样品, 用 HPLC 内标法测定血药浓度, 色谱柱为 Venusil XBP C₁₈(L)(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1% 磷酸水(75:25), 柱温为 30 °C, 检测波长 254 nm, 以 DAS2.0 软件拟合计算药动学参数。结果: 大黄酸的药浓度在 0.019 2 ~ 11.72 mg·L⁻¹ 线性关系良好 ($R^2 = 0.999 1$), 检测限为 0.009 6 mg·L⁻¹, 定量限为 0.019 2 mg·L⁻¹, 提取回收率均大于 80%, 日内、日间精密度的 RSD 均小于 6%。结论: 大鼠灌胃给药大黄酸血药浓度-时间曲线呈二室模型。该法操作简便、快速、灵敏, 适用于大黄酸在大鼠体内的药动学研究。

[关键词] 大黄酸; 药动学; 高效液相色谱法; 固相萃取

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)18-0140-04

Determination of Rhein in Plasma by SPE-HPLC and Its Pharmacokinetic Study in Rats

FENG Su-xiang^{1,2}, XIE Xin-nian¹, LI Jian-sheng¹, QU Ling-bo², LIANG Sheng-wang³, WANG Shu-mei^{3*}

[收稿日期] 20110404(004)

[基金项目] 河南省高校青年骨干教师资助项目(2009GGJS-065); 国家自然科学基金资助项目(81073024); 郑州市科技攻关项目(0910SGYS33390-7)

[第一作者] 冯素香, 在读博士研究生, 副教授, 从事中药药代动力学与新药研究工作, Tel:0371-65680562, E-mail:fengsx221@163.com

[通讯作者] *王淑美, 教授, 硕士生导师, 从事中药质量控制研究工作, Tel:020-39352177, E-mail:shmwang@sina.com

酸加速代谢。

[参考文献]

- [1] 季宇彬. 中药复方化学与药理[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2003: 119.
- [2] 程如海, 李家庚. 中国名方全书[M]. 北京: 科学技术出版社, 2003: 61.
- [3] 张丽, 张村, 肖勇庆. 大黄 5 种饮片化学成分变化规律[J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(12): 839.
- [4] 谢臻, 王术玲, 江滨. 枳实黄酮类成分在大承气汤配伍中的变化规律[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(17): 57.
- [5] Tang W F, Huang X, Yu Q, et al. Determination and pharmacokinetic comparison of rhein in rats after oral

dosed with Da-Cheng-Qi decoction and Xiao-Cheng-Qi decoction[J]. Biomed Chromatog, 2007, 21(11): 1186.

- [6] 韩刚, 安静, 孙海燕. 通脉降脂胶囊质量标准的建立[J]. 中成药, 2005, 27(7): 778.
- [7] Xu F, Liu Y, Zhang Z, et al. Rapid simultaneous quantification of five active constituents in rat plasma by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry after oral administration of Da-Cheng-Qi decoction[J]. Pharm Biomed Anal, 2008, 47(3): 586.
- [8] 闰美娟, 隋峰, 李燕. 大黄各炮制品泻下作用的比较研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(13): 170.
- [9] 由田, 杨臻, 吕晶玉. 过量大黄对小鼠肝脏细胞的毒性作用[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2008, 17(3): 303.

[责任编辑 邹晓翠]

- (1. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008, China;
2. Zhenzhou University, Zhengzhou 450001, China;
3. Guangdong College of Pharmacy, Guangzhou, 510006, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determination of rhein in rats plasma by solid-phase extraction-high performance liquid chromatography, and study the pharmacokinetic. **Method:** SD rats were i. g with rhein after a single dose, blood samples were collected at time intervals. The plasma concentrations of sample in rats were assayed by SPE. The plasma concentrations of rhein were determined by HPLC method and internal standard method. Rhein was eluted on a Venusil XBP C₁₈(L) (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column, using a mobile phase of methanol-0.1% acetic acid water (75:25); and the column temperature was controlled at 30 °C, the UV detector was operated at 254 nm. The pharmacokinetic parameters were calculated by the software of DAS 2.0. **Result:** In rat plasma, rhein was linear in the range of 0.019 2 to 11.72 mg·L⁻¹ ($R^2 = 0.999 1$). Detection limit (LOD) and quantification limit (LOQ) were 0.009 6 and 0.019 2 mg·L⁻¹ respectively. The recovery of rhein from plasma was larger than 80%, and RSDs of intra-day and inter-day were less than 6%. **Conclusion:** The concentration-time curve of rhein was shown to fit two compartment models. This method is accurate, precise and specific, and can be applied to determine the pharmacokinetic of rhein.

[Key words] rhein; pharmacokinetics; HPLC; SPE

大黄酸(Rhein)属单蒽核类1,8-二羟基蒽醌衍生物,是从大黄、何首乌、虎杖等多种传统中药分离提取出的有效成分。现代研究表明大黄酸具有广泛的药理活性,有抗肿瘤、抗炎、抗菌、调节肾功能等作用^[1]。何焯等^[2]研究表明大黄酸对大鼠离体子宫平滑肌条有抑制作用;郭美姿等^[3]研究表明,大黄酸对CCL₄,D-GalN引起的小鼠急性肝损伤具有明显保护作用;大黄酸通过降低糖尿病大鼠的尿蛋白排泄、减轻肾脏肥大、改善胰岛素敏感性、降低血脂水平,有效地防治Ⅱ型糖尿病肾病^[4]。因此,大黄酸有很大的潜在临床药用价值,研究大黄酸在动物体内的药代动力学有重要的意义。国内有对大黄酸在生物样品内测定方法学的报道^[5-7],但采用固相萃取对样品进行处理的报道不多。本研究采用固相萃取处理血浆样品,可显著降低血浆中内源性杂质的干扰,提高检测方法的灵敏度。本文采用SPE-HPLC建立了大鼠灌胃给药后不同时间点大黄酸血药浓度的测定方法,并对其体内药动学规律进行研究,以期开展大黄酸的药物动力学研究提供快速、准确、可靠的分析方法。

1 材料

1.1 仪器 waters 高效液相色谱仪(配waters 2695 Separations Module, waters 2996 Photodiode Array Detector), TGL-16G 台式离心机(上海安亭科学仪器

厂制造),XS105 分析天平(瑞士梅特勒);XK96-A 型快速混匀器(姜堰市新康医疗器械有限公司),KQ-100 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司),移液枪(美国 Thermo Fisher 公司),MDF-U32V 型超低温冰箱(日本三洋株式会社)。

1.2 药品与试剂 大黄酸、1,8-二羟基蒽醌对照品(购自中国药品生物制品检定所,批号分别为110757-200906,110829-199702),大黄酸样品(购自西安应化生物技术有限公司,含量93%),C₁₈固相萃取柱(博纳艾杰尔科技有限公司),甲醇(色谱醇,Fisher公司),乙腈(色谱醇,Fisher公司),磷酸、氯仿等试剂均为分析纯,娃哈哈纯净水。

2 方法

2.1 溶液的配制 精密称取大黄酸对照品约9.6 mg,置100 mL量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,制得96 mg·L⁻¹的储备液,至4 °C冰箱保存备用,临用前用甲醇稀释为不同浓度的对照品溶液。精密称取1,8-二羟基蒽醌对照品,用甲醇溶解并定容成浓度为0.5 mg·L⁻¹的内标溶液。

2.2 给药方案 健康雄性SD(Sprague-Dawley)大鼠(购自河北省实验动物中心,合格证号:SCXK 2008-1-003),体重280~300 g。给药前禁食12 h,自由饮水。以20,40 mg·kg⁻¹两个剂量灌胃给予大黄酸。各大鼠分别于给药前和给药后5,10,15,20,30,

45 min, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 10, 12, 18, 24 h 分别尾静脉取血 0.5 mL, 置肝素钠离心管中离心, 取上清液, 于 -80 °C 冰箱中冷藏备用。

2.3 血浆样品的处理 精密取大鼠血浆 200 μL 置 2 mL 离心管中, 精密加入内标 1,8-二羟基蒽醌溶液 50 μL , 使内标浓度为 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 加入乙腈 1 mL, 涡旋振荡 5 min, 3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 取上清液, 加入 1 mL 的 0.1% 的磷酸水涡旋振荡 5 min, 过 C_{18} 固相萃取柱, 先用 5% 的甲醇水洗去杂质, 再用 2 mL 甲醇洗脱, 收集甲醇洗脱液, 于 40 °C 水浴上用空气吹干, 残渣用 0.1 mL 甲醇溶解, 作为供试品溶液, 取 20 μL 进样分析, 内标法计算血浆中大黄酸的浓度。

2.4 色谱条件 色谱柱 Venusil XBP C_{18} (L) (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm) (博纳艾杰尔科技有限公司), 流动相甲醇-0.1% 磷酸水 (75:25), 柱温 30 °C, 检测波长 254 nm, 流速 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 进样量 20 μL , 内标 1,8-二羟基蒽醌。

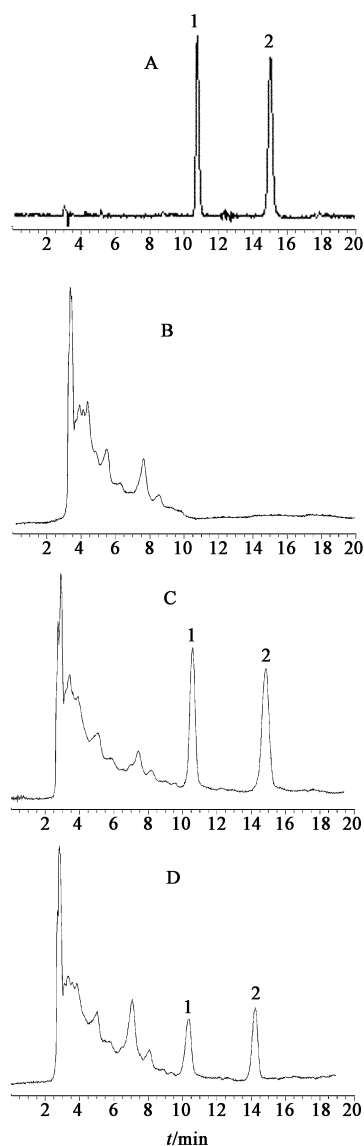
2.5 数据处理 数据用表示, 用 DAS 2.0 药代动力学软件对血药浓度-时间数据进行拟合, 以 AIC 法判断房室模型, 计算药动学参数, 并绘制平均血药时间-浓度曲线。

3 结果

3.1 方法专属性 在上述的色谱条件下, 大黄酸与内标的色谱峰分离良好, 且在血浆样品中的无杂质峰干扰, 高效液相色谱图见图 1。

3.2 标准曲线 取大鼠空白血浆, 每份 200 μL , 精密加入不同量大黄酸对照品标准储备液, 分别加入内标溶液, 使大黄酸质量浓度分别为 0.019 2, 0.048, 0.12, 0.30, 0.75, 1.875, 4.687, 11.72 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 每一溶液中 1,8-二羟基蒽醌的浓度均为 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 按“血浆样品的处理”项下方法操作, 进样, 测定结果以大黄酸峰面积与内标的峰面积比值 Y 为纵坐标, 大黄酸血浆浓度 X 为横坐标, 进行线性回归计算, 求得大黄酸回归方程为 $Y = 0.9724X - 0.0516$ ($R^2 = 0.9991$); 表明大黄酸在 0.019 2 ~ 11.72 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 呈良好的线性关系; 定量限为 0.019 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。按信噪比 3:1 计, 大黄酸的检测限为 0.009 6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

3.3 回收率 精确吸取大鼠空白血浆 200 μL , 将大黄酸对照品标准储备液加入到空白血浆中, 配制浓度为 0.048, 0.75, 4.687 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 1,8-二羟基蒽醌的浓度均为 0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的质控血浆各 5 份, 按



A. 大黄酸对照品加内标; B. 空白血浆; C. 空白血浆加对照品和内标; D. 血浆样品加内标; 1. 大黄酸; 2. 1,8-二羟基蒽醌

图 1 大黄酸对照品及样品 HPLC 色谱

“血浆样品的处理”项下方法处理后进行分析, 根据内标法计算药物浓度, 按大黄酸峰面积与未经提取的相同量对照品 (甲醇液) 的峰面积比较, 计算绝对回收率; 根据测定浓度与加入量比较计算方法回收率。高 (4.687 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、中 (0.75 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、低 (0.048 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 3 个浓度的绝对回收率分别为 (88.6 \pm 3.67)%, (85.1 \pm 3.42)%, (83.2 \pm 4.50)% ($n = 5$); 方法回收率分别为 (90.6 \pm 3.59)%, (89.2 \pm 3.92)%, (87.9 \pm 4.06)%。

3.4 精密度 精确吸取大鼠空白血浆 200 μL , 加入大黄酸对照品标准储备液, 配制成为高 (4.687 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、中 (0.75 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、低 (0.048 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 3 个质

量浓度的血浆样品,1,8-二羟基蒽醌的浓度均为 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,按“血浆样品的处理”项下方法处理后进行分析,根据内标法计算药物浓度。每一个质量浓度日内重复测定5次,并连续测定5d,每天1次,大黄酸日内精密度分别为4.74%,4.67%,5.12%,日间精密度分别为4.60%,4.88%,5.91%。

3.5 稳定性 取含大黄酸 $0.75 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的质控血浆样品,按“血浆样品的处理”项下方法处理,分别于0,2,4,6,8,12,24 h进行测定,考察室温放置24 h样品溶液的稳定性,大黄酸浓度RSD为5.1%。取上述高、中、低3个质控血浆样品反复冻融3个循环,测定血浆样品从 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 至室温的冻融稳定性,高、中、低三个浓度大黄酸RSD分别为4.8%,5.6%,5.8%。取高、中、低3个质控血浆样品,考察样品在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存一周内的稳定性,高、中、低3个浓度大黄酸的RSD分别为3.9%,4.1%,4.5%,表明大黄酸血浆样品基本稳定。

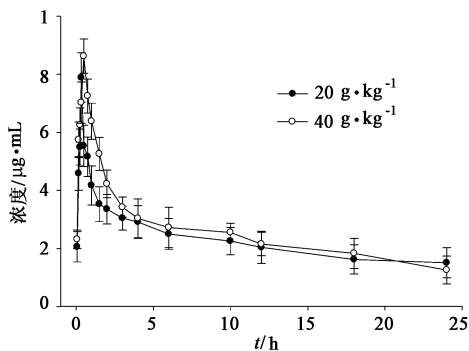


图2 大鼠灌胃不同剂量的大黄酸血药浓度-时间曲线

3.6 药代动力学 大鼠灌胃给予40,20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 2个剂量的大黄酸后在不同的时间点采集血浆,按上述条件测定高、低2个剂量不同时间的血药浓度,所得数据用DAS 2.0药动学软件进行处理,计算药代动力学参数。平均血药浓度-时间曲线见图2,主要药代动力学参数见表1。

表1 大鼠灌胃给予大黄酸后的药代动力学参数($\bar{x} \pm s, n=5$)

参数	单位	大黄酸 $20 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	大黄酸 $40 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$
$t_{1/2\alpha}$	h	0.255 ± 0.082	0.225 ± 0.065
$t_{1/2\beta}$	h	1.465 ± 1.490	1.164 ± 0.491
t_{\max}	h	0.333 ± 0.093	0.50 ± 0.136
C_{\max}	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0.789 ± 0.161	0.862 ± 0.299
$\text{MRT}_{(0-t)}$	h	15.20 ± 7.83	13.91 ± 6.07
$V1/F$	$\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$	14.93 ± 4.96	26.16 ± 3.64
CL/F	$\text{L}\cdot\text{h}\cdot\text{kg}^{-1}$	1.113 ± 0.370	3.453 ± 0.971
$\text{AUC}_{(0-t)}$	$\text{mg}\cdot\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$	7.555 ± 4.520	10.60 ± 4.51
$\text{AUC}_{(0-\infty)}$	$\text{mg}\cdot\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$	8.981 ± 5.020	11.58 ± 4.92

4 讨论

大鼠单次灌胃20,40 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 2个剂量大黄酸后。对不同时间点的平均血药浓度-时间曲线,用DAS 2.0程序进行拟合,结果符合二房室模型,与文献报道基本一致^[5]。从大黄酸血药浓度-时间曲线可知,大鼠给予高、低2个浓度的大黄酸后,吸收迅速,随后快速消除,到一定血药浓度后缓慢消除,提示临床应用时应注意最佳治疗时间窗的选择。从不同给药剂量研究结果表明,大鼠灌胃给予大黄酸后的,随着给药剂量的增加,血浆大黄酸 C_{\max} 和AUC也增加,但与剂量增加不成比例,提示大黄酸在大鼠体内存在着非线性动力学过程。

为了减少样品处理过程中各种因素对分析结果的影响,本文采用内标法计算血药浓度,保证了实验结果的准确性。同时,本文建立了固相萃取处理血浆样品的方法,结果表明血浆内源性杂质干扰小,回收率符合生物样品的要求,并有利于提高测定灵敏度,方法简便。本文通过研究大黄酸在大鼠体内的药代动力学规律,可为大黄酸的药效学和毒理学研究提供有价值的信息,可为该药的进一步临床研究提供参考。

[参考文献]

- [1] 郭姜姿,徐海荣,李孝生. 大黄酸药理作用研究进展[J]. 国外医学中医中药分册,2002,24(3):139.
- [2] 何焯,马力扬,李志强,等. 大黄酸对大鼠离体子宫平滑肌运动的影响[J]. 沈阳药科大学学报,2007,24(4):242.
- [3] 郭姜姿,徐海荣,李孝生. 大黄酸对小鼠急性肝损伤的影响[J]. 中医药研究,2002,18(1):37.
- [4] 郭啸华,刘志红,彭艾,等. 大黄酸对II型糖尿病肾病大鼠疗效观察[J]. 中华肾脏病杂志,2002,18:280.
- [5] 张锦雯,王广基,孙建国,等. HPLC-荧光检测法测定大鼠血浆中大黄酸的浓度及其药代动力学[J]. 中国天然药物,2005,3(7):238.
- [6] 谭力,袁倚盛,杨俊伟,等. 高效液相色谱法测定人血浆中大黄酸含量及药动学研究[J]. 金陵医院学报,1998,11(2):112.
- [7] 蒋心惠,张丹,陈淑杰. 大黄蒽醌衍生物的高效液相色谱法测定及在家兔体内的药代动力学研究[J]. 色谱,2003,21(3):251.

[责任编辑 蔡仲德]